

ПРИЖИЗНЕННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОГЕНЕЗА
КИШЕЧНЫХ ТРИХИНЕЛЛ МЕТОДОМ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Е. В. Тимонов

Кафедра зоологии Курского педагогического института

Живые кишечные трихинеллы флуорохромировались 0.05% акридином оранжевым и 0.05% радамином С. В люминесцентном микроскопе у таких трихинелл стихозома, гонада, ядра гиподермы и клеток светятся ярко-зеленым; гиподерма, матка самок, ректум — темно-зеленым; кутикула, половые папиллы самцов и нервное кольцо — розовым; средняя кишка — ярко-оранжевым цветом. Характер люминесценции не зависит от возраста кишечных трихинелл.

Широкие возможности люминесцентной микроскопии в изучении морфологии и органогенеза мелких паразитических нематод показаны на примерах мигрирующих и мышечных трихинелл и остриц *Aspiculuris tetraptera* (Тимонов, 1969; Тимонов и Малыгина, 1969). Экспериментально установлено, что наиболее эффективными люминофорами в данном случае являются артидиновый оранжевый и родамин С. Используя эти люминофоры, Геллер и Тимонов (1969) выявили ряд морфологических особенностей декапсулированных мышечных трихинелл. Авторы, отмечают, что выстилающая поверхность средней кишки декапсулированных трихинелл имеет складчатую структуру с многочисленными ворсинкообразными выступами. В работе указано на возможность дифференцировки люминесцирующих трихинелл по полу на основе формы гонады, длины ректума, наличия зачатка влагалища на вентральной стороне у самок (рис. 1).

Люминесцентномикроскопический анализ позволяет также проследить морфогенез живых кишечных трихинелл. Получались трихинеллы от белых мышей, экспериментально зараженных декапсулированными личинками двухмесячного возраста. Мышам вводилось через рот на грамм живого веса по 5 личинок, отмытых стерильным физиологическим раствором и пенициллином (1 мл. ед. на 100 мл физиологического раствора). Мыши забивались через каждые 2 часа начиная со второго и по 48 часов после заражения. Кишечные трихинеллы более старших возрастов получались через каждые 24 часа в течение 10 суток. Были также изучены морфологические особенности нескольких самок и самцов через 40 дней после заражения. Последние были получены от спленэктомизированных мышей, зараженных трихинеллезом.¹

Трихинеллы флуорохромировались 0.05% акридиновым оранжевым, приготовленным на физиологическом растворе, в течение 40 минут в термостате при 37°. Вторым люминофор — родамин С и смесь равных объемов растворов этих люминофоров использовались в таких же концентрациях и тех же условиях. После флуорохромирования трихинеллы отмывались физиологическим раствором 4—5 раз и просматривались в люминесцентном микроскопе МЛ-2 в сине-фиолетовых лучах с длиной волны 400—440 нм.

¹ Как показала Л. Н. Силакова, спленэктомия способствует выживаемости кишечных трихинелл у мышей до 50 дней.

Люминофоры мало токсичны для кишечных трихинелл: флуорохромированные трихинеллы сохраняют жизнеспособность до 12 часов.

Люминесцентномикроскопическая картина позволяет выявить морфологические особенности трихинелл. Известно, что различные клетки и ткани организмов неодинаково адсорбируют люминофоры (Мейсель и Корчагин, 1952). Этим же свойством, вероятно, обладают и ткани кишечных трихинелл, так как их органы люминесцируют по-разному. После флуорохромирования акридиновым оранжевым в гиподерме трихинелл на темно-зеленом фоне выделяются ярко-зеленые ядра. Гонада и стихозома ярко-зеленые. Средняя кишка светится желтоватым, а ректальный отдел — темно-зеленым цветом. Пищеварительные железы люминесцируют ярко-красным цветом.

Родамин С вызывает бледно-розовое свечение кутикулы, половых папилл самцов, окологлоточного нервного кольца и ярко-оранжевую люминесценцию средней кишки.

При использовании смеси равных объемов акридинового оранжевого и родамина С эти люминофоры избирательно окрашивают перечисленные органы соответственно в зеленый, красный или оранжевый цвет. Характер люминесценции органов трихинеллы почти не изменяется на всех стадиях онтогенеза. Это дает возможность проследить формирование и развитие основных систем органов.

Морфогенез самок кишечных трихинелл начинается с формирования матки и влагалища. У мышечных самок трихинелл темно-зеленый, зачаток матки отделен от гонады одной клеткой, люминесцирующей ярко-серебристым цветом. Эту клетку можно наблюдать на срезах. Кан (Khan, 1966) назвал ее генитально-соединительной. На вентральной стороне переднего конца мышечных трихинелл находится ярко-зеленое утолщение гиподермы — зачаток влагалища и вульвы. С первых часов после инвазии зачаток матки растет вперед и к 16 часам достигает зачатка влагалища (рис. 2, 3). В длину самка к этому сроку вырастает с 1.27 (у мышечных трихинелл) до 1.64 мм. Длина матки увеличивается соответственно с 0.09 до 0.34 мм. К 20 часам после заражения заканчивается формирование вульвы. Клетки влагалища и матки усиленно делятся и образуют общий просвет этих органов. Через 38 час. после заражения в месте соединения яичника и матки дифференцируется короткий яйцевод. Каудальная часть матки расширяется ампуловидно, образуя своеобразный семеприемник. У 40-часовых самок в этом отделе матки обнаруживаются первые яйца. Люминесцируют они темно-зеленым цветом в отличие от ярко-зеленых яйцеклеток в яичнике. Различная степень яркости люминесценции объясняется, очевидно, разной концентрацией ДНК в них (Мейсель и Корчагин, 1952).

Вторичная люминесцентная микроскопия позволяет установить оплодотворенность самки по наличию в ней спермы. Сперматозоиды имеют вид мелких ярко-зеленых подвижных зернышек. Первые дробящиеся яйца в матке обнаруживаются через 44 часа после заражения. Нам не удалось подтвердить данные Томаса (Thomas, 1965), который наблюдал оплодотворенных самок уже на 35 часу после заражения.

Живые подвижные личинки в нижнем отделе матки появляются через 72 часа после начала инвазии. Они люминесцируют ярко-зеленым цветом. Длина таких личинок 0.08—0.09 мм, наибольшая ширина 0.005 мм.

На 6-й день после заражения кишечные трихинеллы достигают 3.3 мм. При этом матка вырастает до 2.2 мм. Длина яичника увеличивается с 0.27 (у мышечных личинок) до 0.45 мм у 2-дневных кишечных трихинелл, после чего уменьшается до 0.37 мм у 6-дневных форм. В дальнейшем инволюция яичника продолжается и к 40-му дню; длина его не превышает 0.27 мм. Длина стихозомы кишечных трихинелл существенно не изменяется. Сравнение размеров всей трихинеллы и органов, расположенных в переднем, среднем и заднем отделах тела, позволяет сделать вывод, что рост паразита происходит в основном за счет среднего участка тела.

До 10-го дня после заражения матка трихинелл целиком заполнена дробящимися яйцами и формирующимися личинками. После этого срока в каудальной части матки становится яиц меньше; они как бы свободно плавают в семенной жидкости. У 40-дневных самок в ампуловидном расширении матки встречаются лишь единичные яйца. Однако средний и передний отделы матки трихинелл еще заполнены дробящимися яйцами и личинками. Нам не удалось наблюдать самок, свободных от яиц и личинок.

При флуорохромировании трихинелл родамином С хорошо выявляются чехлики линек, люминесцирующие бледно-розовым цветом. Первая линька у самок наступает через 12—16 час. а вторая — между 28—36 час. после заражения.

У самцов мышечных трихинелл гонада на проксимальном конце образует изгиб — зачаток семяпровода, который в первые часы после заражения растет назад к ректальной части кишечника. К 6-му часу после заражения семяпровод достигает дистальной части ректума и соединяется с ним, образуя клоаку. В дальнейшем происходит интенсивный рост нижнего отдела семяпровода в длину и в диаметре. В этом месте к 27-му часу образуется семенной мешок, заполненный спермой (рис. 4). В длину самец растет, как и самка, за счет среднего участка тела. Семидневные самцы вырастают до 2.1 мм. В более поздние сроки размеры самцов не изменяются. Сперму в семенном мешке самца можно обнаружить во все сроки, вплоть до 40-го дня после заражения. Продолжающийся в течение всей жизни сперматогенез у самцов, а также обнаружение 40-дневных самок с большими запасами спермы в матке позволяют сделать предположение, что самцы способны многократно оплодотворять самок. Чехлики линек обнаруживаются у самцов в периоды с 12-го по 16-й и с 26-го по 34-й час после заражения.

Пищеварительная система кишечных трихинелл претерпевает существенные изменения по сравнению с мышечными формами. В период их роста значительно удлиняется средняя часть кишечника. У сформированных трихинелл удается наблюдать сокращение стенок приректальной ампулы (рис. 5).

В бациллярных валиках трихинелл обоих полов с 16 часов после заражения наблюдается много серебристых мелких гранул. С 18 часов можно отчетливо различить отдельные вакуолеподобные образования, которые предположительно принимаются за гиподермальные железы (по: Скрябину и Шихобаловой, 1957). Их насчитывается у разных особей от 140 до 156. У трихинелл до 40 час. после заражения эти образования расположены в два ряда в каждом валике; у более старших — на переднем и заднем концах в один ряд, в средней части в два ряда. С 96 час. после заражения бациллярные валики становятся мало заметными.

ВЫВОДЫ

1. Люминесцентная микроскопия позволяет проследить на живых кишечных трихинеллах формирование систем органов. При флуорохромировании кишечных трихинелл смесью равных объемов 0.05% акридинового оранжевого и 0.05% родамина С стихозома, яичник самок, семенник самцов, ядра гиподермы и клеток люминесцируют ярко-зеленым; гиподерма, зачаток матки у самок, ректум — темно-зеленым; кутикула, половые папиллы и нервное кольцо — розовым; средняя кишка — ярко-оранжевым цветом. Характер люминесценции не зависит от возраста кишечной трихинеллы.

2. Матка у самок формируется из зачатка, состоящего из 6—7 клеток, которые в процессе морфогенеза образуют канал. Рост кишечной самки происходит в основном за счет участка тела, соответствующего матке.

3. Половозрелыми самки становятся на 40 час. после заражения. Первые оплодотворенные самки обнаруживаются через 44 час, а сформированные личинки — через 72 часа после начала инвазии. Самок, свободных от яиц и личинок, методом люминесценции не обнаружено.

4. У самцов к 6-му часу после заражения семяпровод соединяется с дистальной частью ректума. К 27-му часу после заражения нижний отдел семяпровода расширяется, превращаясь в семенной мешок, заполненный спермой. Рост самцов в длину происходит в основном за счет средней части тела. Половозрелыми самцы становятся с 27 час. после заражения.

5. Линьки происходят у самок в периоды с 12-го по 16-й и с 28-го по 36-й час; у самцов — с 12-го по 16-й и с 26-го по 34-й час после заражения.

6. Бациллярные ленты представлены у кишечных трихинелл 140—156 вакуолеподобными образованиями, расположенными латерально.

Л и т е р а т у р а

- Геллер Э. Р. и Тимонов Е. В. 1969. Прижизненное изучение мышечных трихинелл вторичной люминесценцией. Тр. ВИГИС, 15.
- Мейсель М. Н. и Корчагин В. П. 1952. Люминесцентномикроскопическое выявление нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов. Бюлл. exper. биол. и мед., 33 (3) : 49—54.
- Скрябин К. И., Шихобалова Н. П. и Орлов И. В. 1957. Основы нематодологии, 4 : 9—30.
- Тимонов Е. В. и Малыгина А. Н. 1969. Первичная и вторичная люминесценция ювенольных и имагинальных форм остриц *Aspiculuris tetraptera* (Schulz, 1924). Учен. зап. Курского пед. инст., 59 : 148—154.
- Тимонов Е. В. 1969. Изучение мигрирующих личинок трихинелл методом люминесцентной микроскопии. Учен. зап. Курского пед. инст., 59 : 61—69.
- Khan A. 1966. The postembryonic development of *Trichinella spiralis* with special reference to ecdysis. Jl. parasitol., 52 (2) : 248—259.
- Thomas H. 1965. Beiträge zur Biologie und mikroskopischen Anatomie von *Trichinella spiralis* (Owen, 1835). Zschr. f. Tropenmed. u. Parasit., 16 (2) : 148—180.

THE STUDY OF MORPHOGENESIS OF INTESTINAL TRICHINELLIDS IN VITRO BY THE LUMINISCENT METHODS

E. V. Timonov

S U M M A R Y

Living intestinal trichinellids were fluorochromized with 0.05% acridine orange and 0.05% rhodamine C. Under luminiscent microscope stichosome, gonads, nuclei of hypoderma and cells phosphoresced with bright-green; hypoderma, uterus of females, rectum with dark-green; cuticle, genital papilles of males, and nerve ring with pink; midgut with bright-orange color. The nature of luminiscence does not depend on age of intestinal trichinellids.

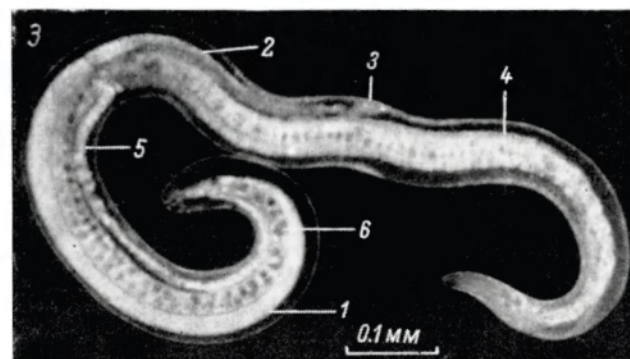
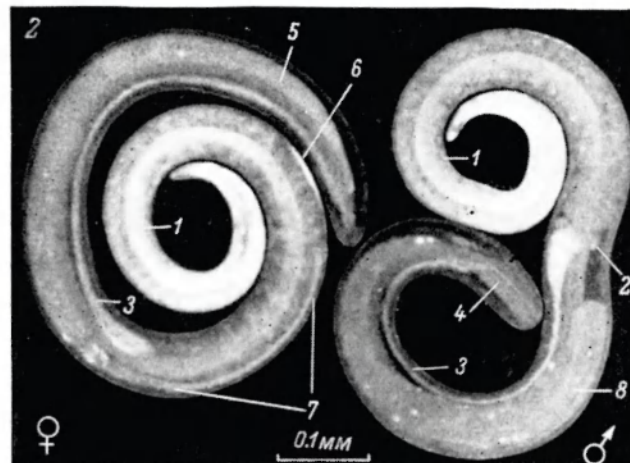
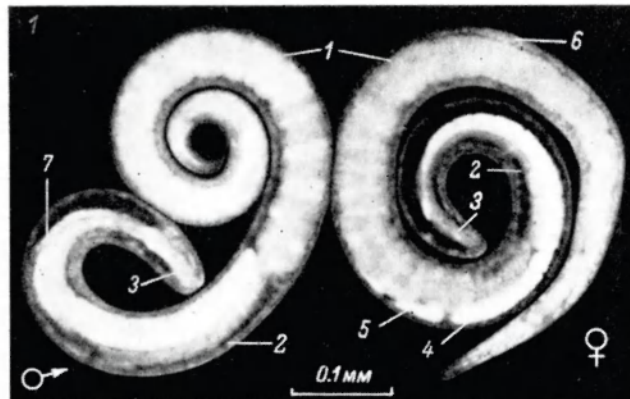


Рис. 1. Декапсулированные мышечные трихинеллы.

1 — стихозома; 2 — средняя кишка; 3 — ректум; 4 — яичник; 5 — зачаток матки; 6 — зачаток влагалища; 7 — семенник.

Рис. 2. Кишечные трихинеллы через 12 часов после заражения.

1 — стихозома; 2 — пищеварительные железы; 3 — средняя кишка; 4 — ректум; 5 — яичник; 6 — зачаток влагалища; 7 — зачаток матки; 8 — семенник.

Рис. 3. Самка кишечной трихинеллы через 16 часов после заражения.

1 — яичник; 2 — формирующаяся матка; 3 — формирующееся влагалище; 4 — стихозома; 5 — средняя кишка; 6 — бациллярный валик.

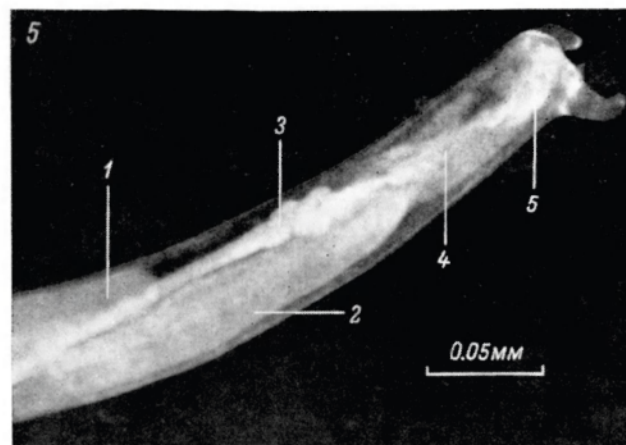


Рис. 4. Самец кишечной трихинеллы через 8 дней после заражения.

1 — семенник; 2 — семенной мешок; 3 — ректум; 4 — стихозома.

Рис. 5. Задний конец самца кишечной трихинеллы через 113 часов после заражения.

1 — семенник; 2 — семенной мешок; 3 — сократившаяся приректальная ампула средней кишки; 4 — ректум; 5 — анальное отверстие.